

УДК 616.342-002.44-07-085+616.61-002.3-06

КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *REG1A* ТА *TGFB1* У КЛІТИНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ЩУРІВ ЗА ДІЇ СТРЕСУ

А. С. ЮЕТ, К. О. ДВОРЩЕНКО, Д. М. ГРЕБІНИК, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету ім. Тараса Шевченка
Україна, 01601, місто Київ-601, вул. Володимирська, 64/13,
email: dmytrogrebinyk@knu.ua

Виразкова хвороба шлунку є поширеним захворюванням шлунково-кишкового тракту, смертність від якої становить 5-10 % у всьому світі. Метою роботи було кількісно проаналізувати рівень експресії генів *Reg1a* (кодує регенеративний білок) та *Tgfb1* (кодує мультифункціональний цитокін) у клітинах слизової оболонки шлунку щурів за дії експериментального іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Щурів виводили з експерименту через 0,5, 1, 2, 3 год впливу стресу та через 12 і 24 год після його відміни. Експресію генів досліджували на виділеній тотальній РНК щурів за допомогою ЗТ-ПЛР у реальному часі (RT-qPCR), результати якої обчислювали відносним порівняльним методом («ΔΔC_t Method»). Інтенсивність продукування супероксидного аніон-радикалу визначали за накопиченням ХТТ-формази. Вміст білка встановлювали за методом Лоурі. Виявлено посилення експресії як гена *Reg1a* (на 1, 2, 3 год), так і *Tgfb1* (на 0,5, 1, 2 і 3 год) на тлі зростання вмісту супероксидного аніону на 0,5, 1, 2 і 3 год під час стресового впливу. У той же час, при загоєнні виразок експресія зазначених генів наближалась до контрольних значень на 24 год після дії стресу для *Reg1a*; та на 12 год для *Tgfb1* (рівень утворення супероксидного аніон-радикала повертався до контролю на 12 год). Наявність позитивної кореляції між патернами експресії цих генів може свідчити про їх плейотропний ефект під час регенерації виразкових пошкоджень клітин шлунку щурів.

Ключові слова: стрес; виразка шлунку; ЗТ-ПЛР у реальному часі, експресія генів *Reg1a*, *Tgfb1*.

Вступ. Поява виразок у слизовій оболонці шлунку, ймовірно, є наслідком сукупного впливу багатьох генетичних, екологічних, клітинних, біологічних, фармакологічних, психосоматичних та нервово-психічних факторів, які, у свою чергу, викликають зміни в експресії генів, ініціюють посилення виробництва активних форм кисню та прозапальних цитокінів, знижуючи клітинні рівні антиоксидантів; порушують мікросудинну циркуляцію крові та секрецію бікарбонатів тощо (Zhou et al, 2017). Не дивлячись на численні дані літератури, на сьогодні, розуміння чітких молекулярно-біологічних аспектів утворення та загоєння виразок є актуальним, і вимагає проведення подальших досліджень. Основна функція регенеративного білка (regenerating islet-derived protein 1a or a lectin-related protein), який кодується геном *Reg1a*, полягає в забезпеченні регенераційних процесів у клітинах шлунково-кишкового тракту (ШКТ) під час пошкодження різного генезу, зокрема виразок (Hongli et al, 2021). Моделювання експресії *Reg1a* в клітинах ШКТ забезпечується впливом різноманітних цитокінів, включно з ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-22 та

трансформуючим фактором росту-β1 (TGF-β1), котрий кодується геном *Tgfb1* (Mageriowska et al, 2019). Отже, метою роботи було кількісно проаналізувати рівень експресії генів *Reg1a* та *Tgfb1* у клітинах слизової оболонки шлунку щурів за дії стресу.

Матеріали та методи. У дослідженні було дотримано міжнародних рекомендацій щодо проведення експериментів із використання тварин згідно Європейської конвенції. Статевозрілих щурів-самців поділяли на 2 експериментальні групи (70 тварин): контроль (10 особин) та модель іммобілізаційного водно-імерсійного стресу (Zhou et al, 2017). Тварин виводили з експерименту через 0,5, 1, 2, 3 год впливу стресу та через 12 та 24 год після його відміни. РНК виділяли за методом Chomczynski (Chomczynski et al, 1987). ЗТ-ПЛР у реальному часі проводили за допомогою набору «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва) згідно протоколу виробника: синтез кДНК 50 °C – 30 хв; ініціююче плавлення 95 °C – 15 хв; 40 циклів: денатурація ДНК 95 °C – 15 с; ренатурація 50 °C – 35 с; добування ланцюга 72 °C – 30 с. Було

використано послідовності праймерів: для *Regla* прямий – AGCCTGCAGAGATTGTTGAC і зворотний – CCATAGGGCAGTGAGGCAAG; для *Tgfb1* прямий – CTTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGCTGC і зворотний – CACGATCATGTTGGACAAGCTGCTCC; для *Actb* (ендогенний контроль) прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT і зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Ефективність ампліфікацій, обчислена за формулою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$), була однаковою – 81 %; slope = -3,6. Аналіз кривих плавлення застосовували для уникнення формування димерів праймерів. Відносний рівень експресії генів нормалізували до експресії *Actb* та розраховували, застосовуючи « $\Delta\Delta C_T$ Method» (Livak et al, 2001). Інтенсивність продукування супероксидного аніон-радикалу визначали за накопиченням ХТТ-формазау (Sutherland et al, 1997). Нормально розподілені дані обчислювали за допомогою One-way ANOVA («GraphPad Prism 8.4.3», «GraphPad Software Inc.», США). Результати наведено у вигляді середнього арифметичного \pm стандартне відхилення. Кореляційний аналіз проводився за допомогою коефіцієнту лінійної кореляції Пірсона (r). Результати розглядали як значущі при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Було виявлено, що експресія *Regla* збільшувалась у 2; 2,6 і 3,7 раза ($p \leq 0,0001$) відносно контролю на 1, 2, 3 год стресового впливу відповідно. При загоєнні пошкоджених клітин слизової оболонки шлунка рівень експресії цього гена знижувався у 2,2 і 3,1 раза ($p \leq 0,0001$) через 12 та 24 год після дії стресового чинника відповідно у порівнянні з тваринами при 3-годинній дії стресу; однак лишався підвищеним в 1,7 раза ($p \leq 0,0001$) відносно контролю через 12 год. (рис. 1). Крім цього, було показано посилення рівня експресії гена *Tgfb1* в 5,8; 5,6; 5,1 ($p \leq 0,0001$) і 2,1 раза ($p \leq 0,001$) відносно контрольних тварин на тлі зростання вмісту супероксидного аніону в 3, 3,2; 2,8 та 2,4 раза ($p \leq 0,0001$) під час стресового впливу на 0,5, 1, 2 і 3 год відповідно. Експресія цього гена наближалась до контролю на 12 год (рис. 2), як і рівень утворення супероксидного аніон-радикала, що загалом відповідає активуванню регенераційних процесів у клітинах. Також було знайдено сильну позитивну кореляцію між експресією генів *Regla* та *Tgfb1* ($r = 0,9$, $p = 0,023$) за дії іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Отримані нами дані можуть свідчити про те, що гіперекспресія *Tgfb1*, зумовлена накопиченням активних форм кисню під час дії стресору, індукує TGF- β 1-сигнальний шлях, який може

посилювати рівень експресії *Regla* у перші години стресу та під час загоєння виразки шлунка.

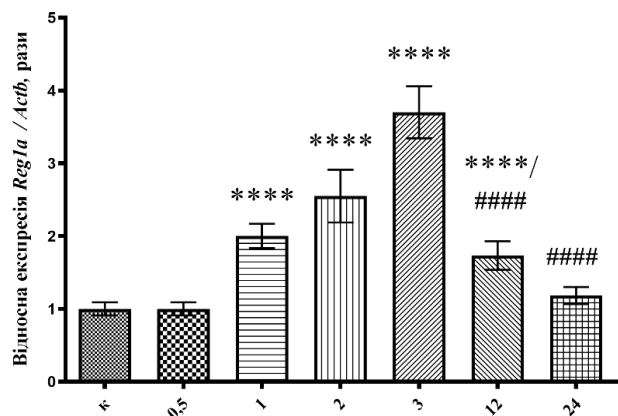


Рис. 1. Рівень експресії гена *Regla* у клітинах слизової оболонки шлунку щурів за дії іммобілізаційного водно-імерсійного стресу: 1 – контроль; 0,5-24 – години відповідно; **** – $p \leq 0,0001$ порівняно з контрольною групою; #### – $p \leq 0,0001$ порівняно з тваринами при 3-годинній дії стресу

Fig. 1. *Regla* gene expression level in rat gastric mucosa cells under the effects of immobilized-water immersion stress: 1 – control; 0.5-24 hours, respectively; **** – $p \leq 0.0001$ compared to the control group; #### – $p \leq 0.0001$ compared to animals with 3-hour exposure to stress

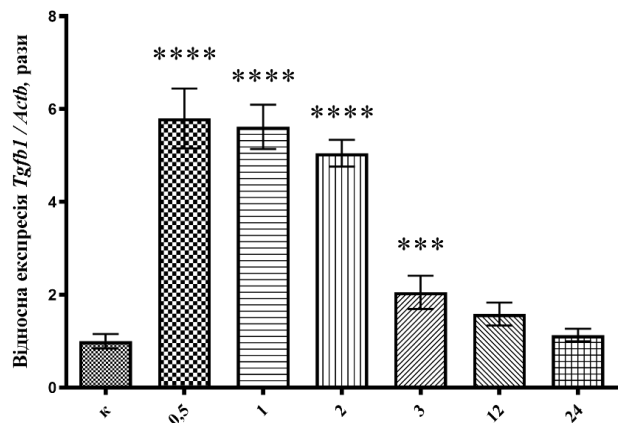


Рис. 2. Рівень експресії гена *Tgfb1* у клітинах слизової оболонки шлунку щурів за дії іммобілізаційного водно-імерсійного стресу: 1 – контроль; 0,5-24 – години відповідно; **** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно з контрольною групою

Fig. 2. *Tgfb1* gene expression level in rat gastric mucosa cells under the effects of immobilized-water immersion stress: 1 – control; 0.5-24 hours, respectively; **** – $p \leq 0.0001$; *** – $p \leq 0.001$ compared to the control group.

Повернення рівня експресії *Tgfb1* до фізіологічних значень через 12 год після нівелювання дії стресору, і пригнічення утворення супероксидного аніон-радикала активує процеси загоєння шляхом моделювання імунної відповіді та зменшення запалення, що поступово призводить до відновлення патерна експресії гена *Reg1a*.

Висновки. Молекулярно-біологічними методами проаналізовано експресію генів *Reg1* та *Tgfb1* у клітинах слизової оболонки шлунку щурів за умов виразкоутворення, спричинених дією іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Виявлено посилення експресії як гена *Reg1a* (на 1, 2, 3 год), так і *Tgfb1* (на 0,5, 1, 2 і 3 год) на тлі зростання вмісту супероксидного аніону на 0,5, 1, 2 і 3 год під час стресового впливу. При загоєнні виразок експресія зазначених генів наближалась до контрольних значень на 24 год після дії стресу для *Reg1a*; та на 12 год для *Tgfb1* (вміст супероксидного аніон-радикала повертався до контролю на 24 год). Наявність позитивної кореляції між патернами експресії цих генів може свідчити про їх плейотропний ефект під час регенерації виразкових пошкоджень клітин слизової оболонки шлунку щурів.

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування та подяки: дослідження не отримувало будь-якого гранту від фінансуючих

установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

References:

1. Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156–9. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
2. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
3. Sutherland M. W., Learmonth B. A. (1997). The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radic. Res.* 27, 3, 283–289. <https://doi.org/10.3109/10715769709065766>
4. Zhou, Z., Huang, P., Song, G., et al. (2017). Comparative proteomic analysis of rats subjected to water immersion and restraint stress as an insight into gastric ulcers. *Molecular Medicine Reports*, 16, 5425-5433. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7241>
5. Hongli M., Jinlin J., Jinxiu S., Shanfeng Zhang, et al. (2021). Protective and anti-inflammatory role of REG1A in inflammatory bowel disease induced by JAK/STAT3 signaling axis. *International Immunopharmacology*, 107304, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107304>
6. Magierowska K., Bakalarz D., Wójcik D., et al. (2019). Time-dependent course of gastric ulcer healing and molecular markers profile modulated by increased gastric mucosal content of carbon monoxide released from its pharmacological donor. *Biochemical Pharmacology*, 163, 71-83, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.011>

QUANTITATIVE ANALYSIS OF *REG1A* AND *TGFB1* GENE EXPRESSION IN GASTRIC MUCOSA CELLS OF RATS UNDER THE EFFECTS OF IMMOBILIZED-WATER IMMERSION STRESS

A. HUET, K. DVORSHCHENKO, D. GREBINYK, L. OSTAPCHENKO

*Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine»,
Taras Shevchenko National University of Kyiv
email: dmytrogrebinyk@knu.ua*

*Gastric ulcer disease is the most common disease of the gastrointestinal tract, with a mortality rate of 5-10 % worldwide. The aim of the work was to quantitatively analyze the level of expression of genes *Reg1a* (encodes a regenerative protein) and *Tgfb1* (encodes a multifunctional cytokine) in rat gastric mucosa cells under the influence of experimental immobilization water-immersion stress. Rats were removed from the experiment after 0.5, 1, 2, 3 hours of exposure to stress and after 12 and 24 hours after its withdrawal. Gene expression was studied on the isolated total RNA of rats using RT-PCR in real time (RT-qPCR), the results of which were calculated by the relative comparative method (" $\Delta\Delta C_T$ Method"). The intensity of superoxide anion-radical production was determined by the accumulation of CTT-formazan. The protein content was determined by the Lowry method. An increase in the expression of both the *Reg1a* gene (at 1, 2, 3 h) and *Tgfb1* (at 0.5, 1, 2, and 3 h) was detected against the background of an increase in the*

content of superoxide anion at 0.5, 1, 2, and 3 h under time of stressful exposure. At the same time, during the healing of ulcers, the expression of these genes approached the control values at 24 h after stress for *Reg1a*; and at 12 h for *Tgfb1* (the level of superoxide anion radical formation returned to control at 12 h). The presence of a positive correlation between the expression patterns of these genes may indicate their pleiotropic effect during the regeneration of ulcerated gastric mucosa cells of rats.

Keywords: stress; stomach ulcer; RT-qPCR, Reg1a, Tgfb1 gene expression

Отримано редколегією 23.10.2024

ORCID ID

Алевтина Юет: <https://orcid.org/0000-0002-6511-2201>

Катерина Дворщенко: <https://orcid.org/0000-0003-3118-9355>

Дмитро Гребіник: <https://orcid.org/0000-0001-7065-346X>

Людмила Остапченко: <https://orcid.org/0000-0001-7181-6048>